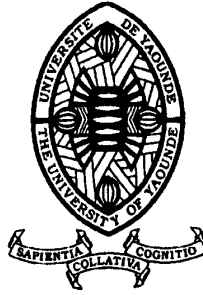


REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
ECOLE NORMALE SUPERIEURE
DEPARTEMENT DE PHYSIQUE



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace – Work – Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I
HIGHER TEACHER TRAINING COLLEGE
DEPARTMENT OF PHYSICS

MODELISATION DU COMPORTEMENT DES PHENOMENES DE POLARISATION DANS LES CELLULES VIVANTES: CAS DES EPITHELIUMS INTESTINAUX

Mémoire présenté et soutenu en vue de l'obtention du Diplôme de professeur
de l'enseignement secondaire 2ème
grade (DIPES II)

Par :

**ELOUNDOU Barnabé
Dieudonné
Licencié en physique**

Sous la direction
**Professeur
ATANGANA JACQUES
Maître de
Conférences**

**Année Académique
2015-2016**





AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire de Yaoundé I. Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : biblio.centrale.uyi@gmail.com

WARNING

This document is the fruit of an intense hard work defended and accepted before a jury and made available to the entire University of Yaounde I community. All intellectual property rights are reserved to the author. This implies proper citation and referencing when using this document.

On the other hand, any unlawful act, plagiarism, unauthorized duplication will lead to Penal pursuits.

Contact: biblio.centrale.uyi@gmail.com

Table des matières

Dédicace	ii
Remerciements	iii
Resumé	v
Abstract	vi
Introduction Générale	1
1 Généralités sur les cellules vivantes	2
1.1 Physiologie de l'intestin	2
1.1.1 Généralités	2
1.1.2 L'épithélium intestinal	3
1.1.3 Membrane basale	4
1.1.4 Jonctions cellulaires	4
1.1.5 Jonctions étanches	4
1.1.6 Jonctions d'ancrage	5
1.1.7 Jonctions communicantes	5
1.2 Transport transépithélial	6
1.2.1 Système complexe membranaire	7
1.2.2 Déplacement de particules	7
1.2.3 Gradient électrochimique	8
1.2.4 L'osmose	9
1.2.5 Transport transcellulaire	9

1.2.6	Les canaux ioniques	10
1.3	Mécanismes d'absorption et sécrétion de l'eau et des principaux électrolytes par l'intestin	11
1.3.1	Le patch clamp	12
1.3.2	La chambre d'Ussing	12
1.4	But du travail	13
2	Modélisation de la chambre d'Ussing	15
2.1	Modélisation des tissus biologiques	15
2.1.1	Comportement des tissus dans un champ électrique : Conductivité des tissus	16
2.1.2	Modélisation de l'électrolyte et des électrodes de référence en chambre d'Ussing	22
2.2	Conclusion	23
3	Resultats et discussions	24
3.1	Relaxation et résonance	24
3.2	Description empirique de relaxation diélectrique	28
3.3	L'équation de Cole-Cole	30
3.4	Equation Cole-Davidson	30
3.5	L'équation Havriliak-Negami	31
3.6	La description de Fuoss-Kirkwood	33
	Implications pédagogiques dans le système éducatif	35
	Conclusion générale et perspectives	36
	Bibliographie	38

Table des figures

1.1	Schéma de l'intestin grêle à différentes échelles adaptées [4 ,5]	3
1.2	Schéma d'une cellule entérocyte et ses jonction [12]	6
1.3	Comparaison des concentrations des principaux électrolytes entre l'intérieur et l'extérieur[13]	7
1.4	Représentation des différents types de transport cellulaires [6]	11
3.1	Courbe de la dispersion diélectrique et de perte pour un composé polaire dans la phase condensée. En vert(ε') en bleue (ε'')	27
3.2	Courbe Cole-Cole pour un seul temps de relaxation (calculé) $\varepsilon'' = f(\varepsilon')$	29
3.3	Courbes de dispersion et de perte pour l'équation Cole-Davidson avec $\beta = 0.5$.	31
3.4	Courbes de dispersion et de perte pour l'équation Havriliak-Negami avec $\beta = 0.5$	32

Dédicace

Je dédie ce mémoire à :

- **Dieu** le maître de toute chose ;
- A ma mère **LEMA Astharie Thérèse** pour tout ce qu'elle a fait pour moi ;
- A mon défunt père **NOAH MELINGUI Dieudonné** pour le travail abattu ;
- A ma fiancée **ASSOUGNA EYEBE Bernadette Laure** pour son soutien ;
- A tous mes enfants **Melvyn , Lionel et Dylan** .

Remerciements

Ce travail n'aurait pas vu le jour sans la volonté et l'abnégation de mon directeur de mémoire, le Professeur **ATANGANA Jacques**, qui a dirigé ce travail, malgré ses lourdes responsabilités. Qu'il me soit aussi permis d'exprimer ma sincère gratitude du fond du cœur et ma profonde reconnaissance ;

- Au professeur **OWONO OWONO Luc Calvin**, Directeur Des Etudes de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé pour ses enseignements et ses conseils avisés ;
- Au Professeur **BEGUIDE BONOMA** ; Chef de Département de Physique à l'École Normale Supérieure pour ses enseignements et ses encouragements lors des moments difficiles ;
- Aux honorables membres du jury pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ce travail ;
- J'adresse aussi mes vifs remerciements à tout le corps professoral du Département de Physique de l'École Normale Supérieure de Yaoundé, à l'instar de au Professeur **NDOUGSA MBARGA Théophile, KENFACK JIOTSA Aurélien** , pour les enseignements de qualité qu'ils ont su nous donner durant les cinq années de notre formation ;
- D'une manière générale, à l'ensemble des enseignants du Département de Physique pour la qualité de leurs enseignements dispensés ;
- A monsieur **DJIOKO Jean Paul** , pour sa disponibilité sans faille, ses remarques et conseils dans le travail malgré ses diverses occupations ;
- Je remercie également du plus profond de mon cœur monsieur et madame

ETOUNA, pour le soutien moral et financier qu'ils ont toujours eu à m'apporter ;

– Je remercie également mes tantes, en particulier **NDZIE Adélaïde**, **BELLA ZOA Rose**, , **ZOA Marie Marie** pour leur soutien de toute nature ;

– Je dois aussi remercier **la famille BOMBA Louis** de la cité verte pour la précieuse assistance qui a aussi permis le bon déroulement de ce travail ;

– A tous mes camarades de promotion pour leur soutien et l'esprit de solidarité qu'ils ont eu à mon égard, même dans les moments les plus difficiles. Je pense à **EBOUEM EBOUEM Jean**, **BIKEK Noé**, **ENABA Jules**, **KOLOKO DEUBOUE Marc**, **LANGOUO LAMBOU Carnegie**, **NKWENKEU NGAMKA William** **WOUKENG PIEBENG Jean**, **WOUMO Théophile**, **BIYA Arthur Claude** ;

– A tous ceux qui ont pu contribuer à l'aboutissement de ce travail, qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

Resumé

Dans cette étude, l'objectif est de présenter un modèle physique des cellules vivantes, le cas d'étude est celui des épithéliums intestinaux. Nous avons procédé à la modélisation par l'usage de la chambre d'Ussing. La modélisation a permis d'aboutir aux équations de Cole. Nous avons expliqué le comportement de la cellule lorsqu'on modifie le paramètre de dispersions β du diélectrique dans la relation de cole-cole. Nous dégageons les outils mathématiques utiles pour la résolution du système dynamique développé puis, nous obtenons les équations de Cole sous ses différentes formes. La correspondance électronique est réalisée à l'aide de MATLAB et SIMULINK en utilisant la relation de Cole comme une simple fonction caractérisant la permittivité en fonction de la fréquence. Les simulations du modèle obtenu sont en accord avec les attentes.

Abstract

In this survey, the objective is to present a physical model of the living cells, the case of survey is the one of the intestinal epithelia. We conducted the modelling by the use of the room of Ussing. The modelling permitted to succeed to the equations of Cole. Did we explain the behavior of the cell when one modifies the parameter of scatterings β of the dielectric in the relation of cole-cole. We clear the useful mathematical tools for the resolution of the dynamic system developed then, we get the equations of Cole under his different shapes. The electronic correspondence is achieved with the help of MATLAB and SIMULINK while using the relation of Cole like a simple function characterizing the permittivity according to the frequency. The simulations of the model gotten are in agreement with the waitings.

Introduction Générale

Les principes actifs candidats pour leur utilisation comme médicaments doivent passer par une succession d'études pour connaître au mieux leur effet sur l'organisme. Les expérimentations *in vitro* constituent les premières étapes de ces études [1]. Elles se font sur des modèles expérimentaux et ont pour objectif d'anticiper leurs effets probables sur les organes entiers voire sur l'homme. Parmi les méthodes d'étude utilisées *in vitro* de l'absorption des principes actifs à travers la barrière intestinale, on peut citer les chambres d'Ussing. Les chambres d'Ussing présentées dans ce travail, représentent un système d'étude du passage des médicaments à travers la barrière intestinale [1]. Elles permettent comme d'autres méthodes d'étudier les phénomènes liés à ces transports transmembranaires, le principal avantage de ce système étant la possibilité d'effectuer des mesures électriques relatives au comportement de la Membrane [2]. Ces mesures électriques sont le reflet des mouvements ioniques à travers la barrière.

L'objectif du travail décrit ici est l'amélioration des chambres d'Ussing ainsi que les clamps électroniques qui y sont associés. Les chambres d'Ussing et les clamps nécessitent la maîtrise non seulement de l'outil, mais aussi du protocole de mesure pour être utilisés avec efficacité. Ce savoir-faire est souvent synonyme d'une longue utilisation, de formation et est réservé à des utilisateurs expérimentés. Le but de ce travail est de présenter les généralités sur les cellules vivantes, modéliser la chambre d'Ussing et les équations de Cole sous ses différentes formes, de les simuler et d'interpréter leurs évolutions dans l'espace.

GÉNÉRALITÉS SUR LES CELLULES VIVANTES

Les épithéliums sont des tissus composés de cellules jointives et interconnectées grâce à des points de jonction spécifiques. Ils forment des barrières sélectives complexes contrôlant le passage des xénobiotiques dans l'organisme. L'épithélium intestinal joue un rôle majeur dans l'absorption des nutriments. Il est en particulier le principal régulateur d'absorption pour les principes actifs administrés par voie orale. L'étude des mécanismes de transport à travers cette barrière est donc indispensable pour tester la biodisponibilité d'un produit [3]. Pour cela plusieurs méthodes de mesure sont connues, nécessitant ou non une instrumentation spécialisée. Les chambres d'Ussing sont majoritairement employées pour étudier les phénomènes de sécrétion et d'absorption à travers la barrière intestinale ou pour tester la viabilité fonctionnelle de l'épithélium intestinal [4]. Dans ce chapitre l'aspect physiologique de la barrière intestinale est décrit afin de comprendre le système. Cette partie comprend une présentation générale des mécanismes de transport transcellulaires (transports passifs et actifs). Elle est suivie d'une description des phénomènes physiques induits et se termine par la présentation des différentes techniques de mesure et d'évaluation en chambres d'Ussing.

1.1 Physiologie de l'intestin

1.1.1 Généralités

L'intestin grêle situé après l'estomac dans le système digestif est le lieu où la majeure partie de l'absorption des nutriments est réalisée. L'intestin humain mesure environ 6 mètres et est composé de trois parties : le **duodénum** (25-30 centimètres), le **jéjunum** (2.5 mètres) et l'**iléon** (3.5 mètres). Il reçoit le chyme, mélange plus ou moins visqueux des aliments et des différents

sucs et sécrétions issus de l'estomac. Le jéjunum de par sa constitution et sa taille favorise les surfaces d'échanges entre la lumière intestinale et le sang. Sa surface d'échange couvre environ 200 à 300m². En effet la paroi de l'intestin n'est pas lisse mais son épithélium forme des microvillosités qui augmentent considérablement la surface d'échange dans le processus d'absorption intestinale la figure 1.1 nous présente le schéma de l'intestin grêle à différentes échelles adaptées.

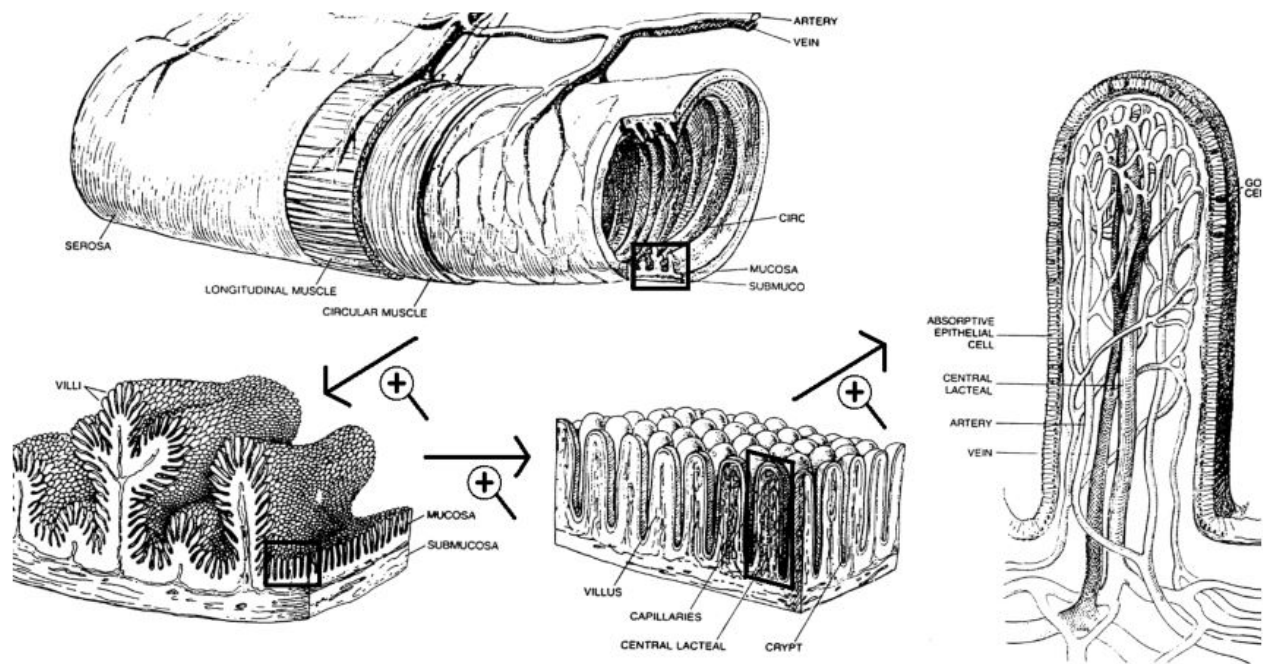


FIGURE 1.1 – Schéma de l'intestin grêle à différentes échelles adaptées [4 ,5]

1.1.2 L'épithélium intestinal

Le passage des molécules et autres ions dans le sang s'effectue au niveau de la muqueuse intestinale. L'épithélium constitue la principale barrière de perméabilité sélective avec la lumière intestinale. Il est composé de plusieurs types de cellules, certaines servant à l'absorption et d'autres à la sécrétion (cellules anthérocytes, cellules caliciformes, cellules intermédiaires, cellules neuroendocrines intestinales, cellules M, cellules de Paneth). Ces cellules sont produites dans les cryptes et se déplacent au cours du renouvellement cellulaire jusqu'à l'extrémité des villosités. Les produits captés par ces cellules dans la lumière intestinale passent ensuite dans le sang grâce à la présence d'un réseau capillaire complexe au contact des villosités.

1.1.3 Membrane basale

Les membranes basales, composées de protéines (Collagène, Laminine, Entactine, Perlécane) sont présentes dans tous les types d'épithélium. Elles sont en forme de treillis et leur taille se situe entre 40 et 120 nm. Leur principale fonction est de séparer les épithéliums des tissus conjonctifs. La lame basale joue un rôle important dans la régénération cellulaire dans le cas où l'épithélium serait endommagé. Dans la plupart des études, la contribution à l'impédance totale de la barrière intestinale de cette lame basale et des couches autres que la musculuse n'est pas prise en compte car supposée perméable. Cependant certaines études tendent à contredire cette hypothèse, évaluant parfois même l'impédance de cette couche comme supérieure au deux tiers de l'impédance totale [6] avec une contribution importante de cette impédance due à la lame basale (fonction de son volume par rapport à celui de la membrane) [7].

1.1.4 Jonctions cellulaires

Toutes ces cellules composant l'épithélium sont reliées les unes aux autres par des jonctions intercellulaires. Il existe plusieurs types de jonctions pour une même cellule. Les jonctions d'ancrage servent à maintenir mécaniquement la structure de l'épithélium. Les jonctions imperméables restreignent le passage de substances entre la lumière intestinale et le fluide extracellulaire du tissu conjonctif. Les jonctions communicantes permettent la communication avec les cellules voisines, en facilitant le passage de petites molécules ou ions entre elles.

1.1.5 Jonctions étanches

Ce type de jonctions évite que les molécules absorbées par la cellule et passées dans le fluide extracellulaire ne retournent dans la lumière intestinale. Cependant leur étanchéité n'est pas totale, en effet bien qu'elles bloquent la circulation des macromolécules, elles peuvent néanmoins laisser passer de plus petites molécules hydrophiles comme le mannitol. De plus dans certains cas ces jonctions peuvent même être régulées par les cellules épithéliales, notamment avec des produits agissant sur le cytosquelette [8]. La structure des jonctions étanches est formée par une chaîne de protéines et molécules de jonction (Occludine, Claudine et JAM) [9, 10,11]. Les propriétés adhésives de ces protéines sont dépendantes de leur milieu, par exemple la

concentration en ions Ca^{2+} .

1.1.6 Jonctions d’ancrage

Le principe général d’une jonction d’ancrage est de rattacher une cellule à sa voisine ou à la lame basale en utilisant leur cytosquelette. Il existe plusieurs types de jonctions d’ancrage comme les desmosomes, les hémidesmosomes ou les jonctions d’adhérence. Les desmosomes et hémidesmosomes ont la même structure, une association de protéines se rattache aux filaments intermédiaires de la cellule. Une plaque cytoplasmique, faites de protéines (Plakoglobine, Plakophilines), est reliée aux filaments (Kératine). Cette même plaque est reliée à des protéines transmembranaires (Cadhérine). La principale distinction entre un desmosome et un hémidesmosome est que l’un sert à rattacher deux cellules entre elles (desmosome) alors que l’autre rattache la cellule à la lame basale (hémidesmosome). Au final, les filaments forment un véritable réseau entre les cellules voisines et la lame basale utilisant les éléments du cytosquelette comme moyen d’attache.

Les jonctions d’adhérence se situent juste en dessous des jonctions étanches. Là aussi un complexe de protéines (Cadhérine, Caténine, Z01, Vinculine) vient rattacher à des filaments (d’Actine) une cellule à l’autre et forment ainsi une “ceinture d’adhérence” parallèle à la face apicale. Ces jonctions existent aussi entre la lame basale et la cellule.

1.1.7 Jonctions communicantes

Ce type de jonctions permet à certains ions (inorganiques) et molécules hydrosolubles de passer d’une cellule adjacente à l’autre. Ceci est possible grâce à des canaux formés entre le cytoplasme de deux cellules par des protéines (Connexine) dont le diamètre est inférieur à 2nm. Ce type d’échange engendre un couplage électrique et chimique. Ces jonctions peuvent s’ouvrir et se fermer selon le pH et le taux de concentration d’ions Ca^{2+} (Ca^{2+} élevé ou pH bas \Rightarrow fermé ; Ca^{2+} bas ou pH élevé \Rightarrow ouvert).

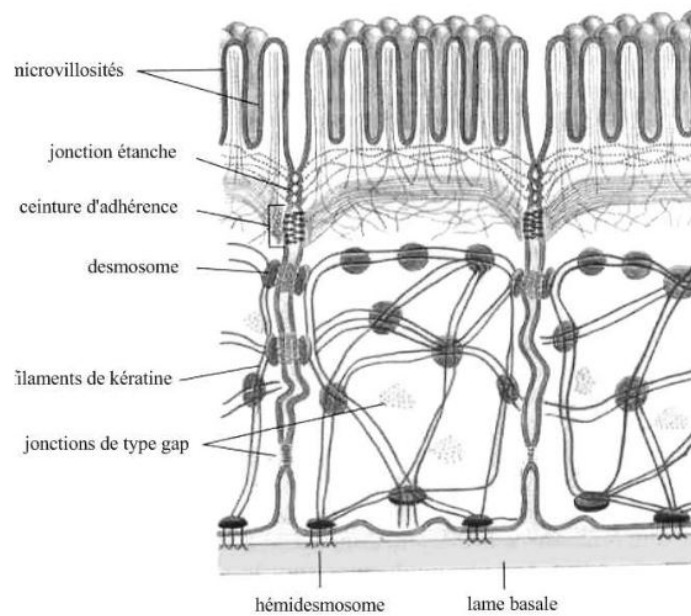


FIGURE 1.2 – Schéma d'une cellule entérocyte et ses jonction [12]

1.2 Transport transépithélial

L'origine des potentiels d'une cellule est due à la différence de charges de part et d'autre de sa membrane. Ce sont les ions inorganiques (K^+ , Cl^- , Na^+) qui sont les principaux responsables de la régulation électrique de la cellule. Du fait du principe d'électroneutralité, les charges négatives et positives à l'intérieur comme à l'extérieur de la cellule s'annulent. Cependant l'asymétrie entre charges intracellulaires et extracellulaires induit une différence de potentiel constante appelée potentiel membranaire. Ce potentiel membranaire est maintenu constant grâce au transport de ces ions à travers la membrane. Le milieu intracellulaire est chargé plus négativement que le milieu extracellulaire, la différence de potentiel membranaire (de l'intérieur vers l'extérieur) est en général comprise entre -20 et $-100mV$.

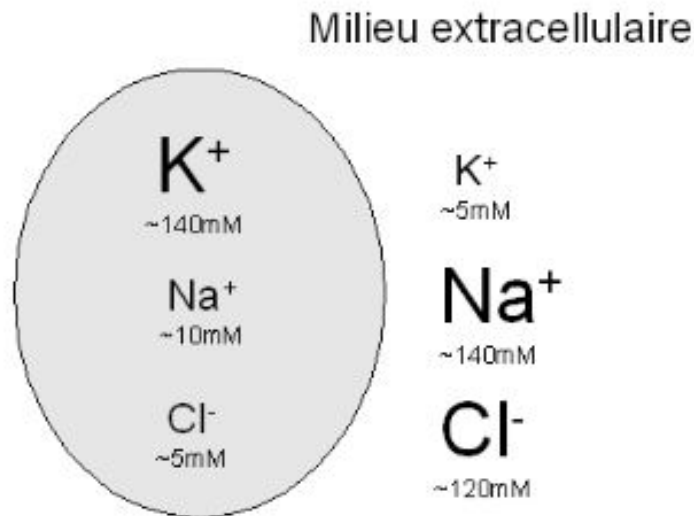


FIGURE 1.3 – Comparaison des concentrations des principaux électrolytes entre l’intérieur et l’extérieur[13]

1.2.1 Système complexe membranaire

Le mouvement de l’eau et des électrolytes entre deux milieux séparés par une membrane est un système complexe. Plusieurs phénomènes visant à chercher un état d’équilibre global, entrent en jeu et sont souvent dépendants de conditions comme la température, le pH ou les différents gradients (concentration, électrique, chimique).

1.2.2 Déplacement de particules

Dans un électrolyte plusieurs modes de déplacement sont possibles pour une particule (chargée ou non) :

1. migration électrique (gradient électrique)
2. diffusion (gradient de concentration)
3. convection (agitation mécanique ou thermique de l’électrolyte)

Le flux total de transport d’un ion est donc défini par la somme des différents flux :

$$\vec{J}_{tot} = \vec{J}_{conv} + \vec{J}_{diff} + \vec{J}_{migr} \tag{1.1}$$

1.2.3 Gradient électrochimique

Un gradient de concentration se crée lorsque dans une solution une molécule est en quantité plus importante dans l'un des milieux séparés par une membrane perméable à cette molécule. Dans le cas d'une molécule chargée ou d'un ion, le gradient de concentration attire naturellement ces particules dans le compartiment le moins concentré. Il crée un gradient électrique en opposition, définissant ainsi un potentiel d'équilibre. Le gradient électrochimique est la différence entre le potentiel membranaire et la force électromotrice (fem) de l'ion générée à l'équilibre ($V_m - E_{2-ion}$), le potentiel électrochimique se calculant comme suit :

$$\mu = \mu_0 + RT \ln\left(\frac{C_2}{C_1}\right) + ZFE \quad (1.2)$$

Avec μ_0 potentiel électrochimique d'un ion à 1M de concentration à 0°C

et avec un potentiel électrique (E) égal à zéro, (Joules) ;

R = constante des gaz parfaits ($8,314472 J.mol^{-1}; K^{-1} \pm 1,5.10^5 J.mol^{-1}; K^{-1}$) ;

T = Température absolue en K ;

C_1 = concentration de l'ion dans le compartiment 1 (moles de soluté/litre de solution) ;

C_2 = concentration de l'ion dans le compartiment 2 (moles de soluté/litre de solution) ;

Z = valence de l'ion ;

F = Faraday ($9.65 \times 10^4 C$) ;

E = différence de potentiel transmembranaire ;

$RT \ln\left(\frac{C_2}{C_1}\right)$: travail nécessaire pour transporter une môle de l'ion contre la différence de concentration transmembranaire [$C_2 - C_1$];

ZFE : travail nécessaire pour transporter une môle de l'ion contre la différence de potentiel transmembranaire E.

A l'équilibre (gradient de concentration compensé par le gradient électrique), l'équation de Nernst devient :

$$E_{2-ion} = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{C_1}{C_2} \quad (1.3)$$

avec : E_{2-ion} = potentiel d'équilibre de l'ion pour lequel μ est nul.

Cette équation permet de calculer le potentiel d'équilibre spécifique à un ion, elle sert à

convertir la différence de concentration de l'ion de part et d'autre de la membrane en une valeur électrique exprimée en mV. Il existe également une équation permettant de déterminer la différence de potentiel membranaire plus généralement en exprimant la distribution réelle des ions lorsque deux solutions différentes se trouvent de chaque côté, et ceci en tenant compte de leur perméabilité. C'est l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz :

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{a_1}[a_1]_2 + \dots + P_{a_N}[a_N]_2 + P_{c_1}[c_1]_1 + P_{c_N}[c_N]_1}{P_{a_1}[a_1]_1 + \dots + P_{a_N}[a_N]_1 + P_{c_1}[c_1]_2 + P_{c_N}[c_N]_2} \quad (1.4)$$

avec : P_{a_1} = perméabilité de la membrane à l'anion 1 ;

$[a_1]_1$ = concentration de l'anion 1 dans le compartiment 1 ;

$[a_1]_2$ = concentration du cation 1 dans le compartiment 2.

1.2.4 L'osmose

L'osmose définit le passage de molécules ou d'ions à travers une membrane lorsque des solutions dont la concentration en solutés est différente des deux côtés. La pression osmotique est le phénomène qui permet à un solvant de passer à travers une membrane de perméabilité sélective du côté de la solution la moins concentrée vers la solution la plus concentrée dans le but de la diluer. Il existe par ailleurs dans certaines cellules des canaux (aquaporine) qui sont dédiés au passage de l'eau et qui contribuent au flux osmotique. La pompe Na^+/K^+ joue également un rôle dans cette régulation osmotique en contrôlant la concentration de Na^+ intracellulaire. La différence de pression osmotique entre deux compartiments est proportionnelle à la différence de concentration du soluté présent dans les solutions. La pression osmotique tout comme la pression hydrostatique a un rôle important sur un épithélium car joue sur la résistance totale. Cette variation pouvant être croissante ou décroissante suivant le type d'épithélium (lâche, serré, ...) [6, 7].

1.2.5 Transport transcellulaire

Les membranes biologiques constituent des barrières présentant une perméabilité très sélective. Les membranes apicales et basolatérales des cellules d'un épithélium constituent les principaux obstacles de la voie transcellulaire. Le passage des molécules et des ions entre une

cellule et son environnement est régulé de façon précise par des systèmes de transports spécifiques. Ces transports jouent un rôle dans :

- l'intégrité de la cellule (volume pH , composition ionique intracellulaire)
- l'absorption et concentration de molécules énergétiques et structurales ainsi que l'élimination des toxines.

Du fait de sa composition lipidique, la membrane plasmique est imperméable aux ions et aux molécules chargées. En effet les lipides qui composent la membrane plasmique sont amphiphiles : ils possèdent une tête hydrophile et une queue hydrophobe. Ces lipides sont regroupés de sorte à former une double couche dont la partie centrale est hydrophobe. La membrane plasmique des cellules n'est pas uniquement composée de lipides, elle contient également plusieurs types de protéines dont certaines traversent de part et d'autre la double couche lipidique. Ces protéines sont appelées transmembranaires. Les chemins empruntés par les molécules sont différents suivant leurs propriétés face à l'épithélium (hydrophile, hydrophobe). Lorsque les molécules ne peuvent diffuser simplement à travers la double couche lipidique, elles utilisent des protéines transmembranaires qui agissent comme transporteurs. Il en existe deux types : les protéines porteuses et les canaux qui permettent un transport actif et passif selon l'énergie demandée et le sens du gradient électrochimique. Un transport passif se définit comme étant non consommateur d'énergie, Il est synonyme de diffusion facilitée et se fait via des transporteurs mais dans le sens du gradient électrochimique. Au contraire un transport actif nécessite de l'énergie pour les transporteurs qui permettent un passage contre le gradient électrochimique.

1.2.6 Les canaux ioniques

Les canaux sont des passages créés dans la membrane plasmique par des protéines pour faciliter le transport d'ions de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule (ou inversement), ce sont les transporteurs les plus rapides. Les ions traversent ainsi la membrane selon le sens créé par le gradient électrochimique, le transport est passif. Ces canaux permettent une diffusion rapide des ions inorganiques à travers la bicouche lipidique. Ils peuvent fluctuer d'un état ouvert à un état fermé et vis versa en fonction de divers paramètres tels qu'un changement chimique, de potentiel, de température ou de pression. Le flux des ions est lui régi par leur concentration.

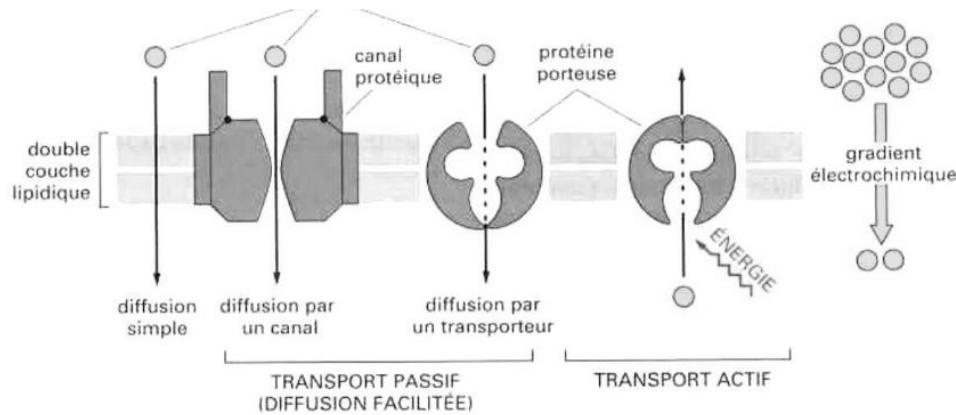


FIGURE 1.4 – Représentation des différents types de transport cellulaires [6]

1.3 Mécanismes d'absorption et sécrétion de l'eau et des principaux électrolytes par l'intestin

L'eau bien qu'étant capable de traverser librement la barrière intestinale par voie paracellulaire ou par voie transcellulaire (aidée par des canaux qui lui sont spécifiques, les aquaporines), voit ses mouvements fortement influencés par les forces osmotiques. Ce sont principalement les ions inorganiques (Na^+ , Cl^- , K^+) qui sont responsables de ses mouvements de part et d'autre de la membrane du fait de leurs différents gradients électrochimiques.

L'absorption de l'eau est étroitement couplée à celle des ions Na^+ dont le passage du milieu luminal au milieu séreux se fait par des transporteurs ou par des canaux. La majeure partie de ces ions entrent dans la cellule par le symport $Na^+/glucose$ (SGLUT-1) [13], Ils ressortent ensuite du côté basolatéral par la pompe Na^+/K^+ ATPase ($3Na^+$ contre $2K^+$) et le glucose par un transporteur spécifique GLUT2 [14]. L'eau passe ainsi du côté luminal au côté basolatéral attirée par le changement d'osmolarité provoqué par l'accumulation des ions Na^+ . Si par exemple ces ions entraînent dans la cellule sans pouvoir en sortir, le phénomène d'osmose provoquerait une entrée massive d'eau dans le cytosol pouvant aller jusqu'à l'éclatement de la cellule, les mécanismes de transport actif sont donc indispensables pour réguler la concentration de solutés intracellulaires. D'autre part, l'eau peut également être sécrétée au niveau de l'intestin grêle par exemple lors de la digestion d'aliments ou encore à cause de l'activation d'une protéine cellulaire, l'Adénylate Cyclase (AC), du côté basolatéral [12]. Dans le premier cas, la

dégradation des aliments en petites molécules provoque une augmentation d'osmolarité dans la lumière intestinale attirant ainsi l'eau du côté séreux vers le côté luminal. L'eau est ensuite progressivement réabsorbée au fur et à mesure de l'absorption des nutriments (et ensuite au niveau du côlon).

1.3.1 Le patch clamp

Parallèlement à ces techniques, il existe une autre méthode pour étudier des mécanismes de transport (principalement les canaux ioniques) à une échelle microscopique, le patch clamp. Cette méthode inventée par E. Neher et B. Sakmann en 1975 permet par l'intermédiaire d'une micropipette en verre, qui se fixe par dépression sur la surface d'une membrane cellulaire, d'observer des courants ioniques unitaires (canal individuel) ou des courants macroscopiques (cellule entière, plusieurs canaux). Cette technique nécessite un matériel particulier et un protocole expérimental rigoureux (placement de la pipette...) mais permet en contrepartie la mesure de courants électriques d'une intensité inférieure au picoampère [7].

1.3.2 La chambre d'Ussing

A la différence des autres méthodes d'étude du passage transmembranaire des molécules in vitro, la chambre d'Ussing [11, 13] permet en plus de mesurer des paramètres électriques épithéliaux tels que le courant de court-circuit (I_{sc}), la différence de potentiel transépithéliale V_m au repos, appelée dans ce mémoire tension basale (V_b) ou encore la conductance membranaire (G). La chambre d'Ussing emprunte son nom de son créateur H.H. Ussing [13], qui en 1950 publia [14] une méthode pour étudier le flux d'ions Na^+ à travers une peau de grenouille et ainsi déterminer sa part d'implication dans le potentiel membranaire. Sa méthode d'investigation consiste à annuler la différence de potentiel de part et d'autre de la membrane, de manière à supprimer le transport passif des ions pour observer uniquement le flux net actif, image du courant résultant dans les conditions de court-circuit.

1.4 But du travail

Les mesures des paramètres électriques I_{sc} et V_b , en chambre d'Ussing sont importantes à la fois pour évaluer la viabilité fonctionnelle du tissu au cours d'une étude mais également pour interpréter les mécanismes de transport membranaires de solutés. La conductance reflète les variations physiologiques de la membrane et donc peut être utilisée comme un indicateur complémentaire pour interpréter l'effet des solutés sur le tissu biologique.

Cette conductance est un paramètre qui se détermine de plusieurs manières dans les études en chambre d'Ussing. La méthode la plus simple consiste à faire le rapport entre I_{sc} et V_b . Une autre méthode, appelée " current clamping ", consiste à imposer un courant continu connu dans la chambre et à effectuer un rapport $\Delta I/\Delta V$. Similairement la méthode " voltage clamping " permet d'imposer une tension membranaire constante en changeant périodiquement de consigne. Une dernière méthode beaucoup moins utilisée, la spectroscopie d'impédance [11,12,13.], consiste à imposer un signal harmonique ($I(\omega) = I_0 \sin(\omega t)$) et à mesurer la tension correspondante ($V(\omega) = V_0 \sin(\omega t + \phi)$) en balayant la fréquence sur une plage déterminée. Avec ces deux signaux il est ensuite possible d'obtenir une admittance, et donc d'étudier les effets capacitifs au tissu. Cependant cette dernière méthode bien qu'idéale car plus précise, pose des problèmes de temps de mesure à cause de la plage de basses fréquences nécessaire. Les mesures en " current clamping " et " voltage clamping " pour le calcul de G constituent donc les solutions les plus intéressantes. Cependant, il reste utile de mesurer en continu et simultanément I_g et I_{sc} . Les variations de ces deux mesures sont en effet similaires car elles reflètent toutes les deux les échanges électrogéniques transépithéliaux. En étant accessible directement aux bornes des électrodes de référence, V_b est le paramètre électrique le plus simple à obtenir. Pour l'interprétation des résultats, avoir les deux paramètres à disposition permet de distinguer plus facilement les comportements qui sont dûs à des erreurs de mesure de ceux qui sont d'origine physiologique. Les systèmes disponibles ne permettant pas de faire ces deux mesures automatiquement, leur détermination et le calcul de G de façon systématique représente l'une des améliorations étudiées. D'une manière générale, l'objectif du travail décrit dans ce mémoire est de faciliter l'accès aux paramètres électriques épithéliaux pour observer leurs évolutions en fonction des produits testés. Dans la suite du document, le travail réalisé est présenté en quatre parties. Premièrement, les modélisations retenues pour représenter les tissus biologiques et les

électrodes sont détaillés et sont suivies de l'identification des modèles en fonction des éléments de notre système. Les bases techniques et méthodologiques avec les moyens utilisés pour les mesures de V_b , I_{sc} et G sont présentées au chapitre deux.

Conclusion

Il était question dans ce chapitre de présenter les généralités sur les cellules vivantes à l'instar de la chambre d'Ussing, dans le chapitre suivant il sera question de présenter la méthode de modélisation.

MODÉLISATION DE LA CHAMBRE D'USSING

La modélisation de la chambre d'Ussing a permis de déterminer le comportement électrique du système. Cette étape constitue la technique nécessaire pour réaliser les mesures des différents paramètres électriques du tissu et principalement celle du courant de court-circuit nécessitant un asservissement de la tension transépithéliale. L'impédance des interfaces électrode/électrolyte et l'impédance du tissu biologique sont les principaux éléments pris en compte dans cette modélisation.

2.1 Modélisation des tissus biologiques

En électrophysiologie, l'une des principales techniques pour caractériser un tissu biologique est la mesure de l'impédance. Cette technique, largement utilisée ces dernières années, a permis le développement de plusieurs modèles représentatifs du comportement électrique des cellules, dont les propriétés sont à la fois conductrices et isolantes. En effet, la double couche lipidique peut être considérée comme un condensateur : elle provoque l'accumulation de charges à sa surface. En contrepartie les protéines de transport permettent un courant de conduction tout comme la voie paracellulaire et sont donc assimilables à des résistances. D'autre part, tous les tissus biologiques du fait de leur hétérogénéité ont un comportement électrique différent, par exemple les épithéliums se comportent différemment des cellules en suspension. En règle générale, les mesures d'impédance effectuées sur ces tissus biologiques sont faites en utilisant ses électrodes interfacées directement avec les tissus [6] ou par l'intermédiaire des milieux physiologiques. Le comportement électrique de ces interfaces est important, il est décrit par des modèles électrochimiques.

2.1.1 Comportement des tissus dans un champ électrique : Conductivité des tissus

Les deux principaux paramètres électriques des tissus biologiques sont la conductivité et la permittivité dépendants respectivement des charges libres et des charges liées. Les dipôles permanents et dipôles induits qui composent un matériau diélectrique, soumis à un champ électrique, s'orientent suivant les lignes de ce champ. Ce phénomène est appelé polarisation et peut être décomposé en deux groupes, les polarisations par déformation (électronique, ionique) et les polarisations par orientation (molaire, dipolaire) [12,14]. Les polarisations n'ayant pas lieu instantanément, elles sont associées à des temps de relaxation. La densité de flux électrique se définit par :

$$\vec{D} = \varepsilon_0 \vec{E} + \vec{P} \quad (2.1)$$

Pour un matériau isotrope, linéaire, homogène,

$$\vec{P} = \varepsilon_0 \chi \vec{E} \quad (2.2)$$

on obtient la relation constitutive.

$$\vec{D} = \varepsilon \vec{E} \quad (2.3)$$

Avec \vec{D} induction électrique (C/m^2);

ε_0 : permittivité du vide (F/m);

\vec{E} : champ électrique (V/m);

\vec{P} : densité de charges de polarisation (C/m^2);

χ : susceptibilité électrique;

ε : permittivité $\varepsilon = \varepsilon_0(1 + \chi) = \varepsilon_0 \varepsilon_r$ (F/m);

ε_r : permittivité relative du matériaux.

Ces dipôles à mobilité réduite peuvent être à l'origine d'un courant de déplacement si le champ électrique est fonction du temps. Dans le cas d'un matériau conducteur soumis à un champ électrique, les charges mobiles créent un courant de conduction. Les tissus biologiques sont quant à eux à la fois conducteurs et isolants du fait des propriétés de la membrane plasmique des cellules [7, 8]. Par conséquent, la densité de courant totale qui traverse le tissu lors de l'application d'un champ électrique se définit par la somme des densités de courant de conduction et de déplacement.

Avec

$$\vec{j} = \vec{j}_c + \vec{j}_d \quad (2.4)$$

et $\vec{j}_c = \sigma \vec{E}$, $\vec{j}_d = \frac{d\vec{D}}{dt} = \varepsilon \frac{d\vec{E}}{dt}$

Avec : \vec{j} : densité de courant total (A/m^2);

(\vec{j}_c) : densité de courant de conduction (A/m^2);

\vec{j}_d : densité de courant de déplacement (A/m^2);

σ : conductivité (S/m).

En tenant compte des pertes dues aux interactions moléculaires (ex : force de frottement...) s'opposant par exemple à l'orientation des dipôles, la permittivité peut être considérée comme complexe :

$$\epsilon^* = \epsilon' - j\epsilon'' \quad (2.5)$$

La partie imaginaire ϵ'' caractérise ces pertes. En considérant ces pertes diélectriques dans le domaine fréquentiel, la densité de courant totale devient :

$$J(\omega) = [\sigma + \omega\epsilon''(\omega) + j\omega\epsilon']E(\omega) \quad (2.6)$$

Soit par analogie avec la loi d'Ohm

$$J(\omega) = \sigma_T^* E(\omega) = j\omega\epsilon_T^* E(\omega) \quad (2.7)$$

Avec

$\epsilon''(\omega)$ partie imaginaire de la permittivité (F/m);

$\epsilon'(\omega)$: partie réelle de la permittivité (F/m);

$j = \sqrt{-1}$;

σ^* : conductivité totale complexe

$$(S/m); \sigma_T^* = \sigma_T' - j\sigma_T'' \quad (2.8)$$

Avec

$$\sigma_T' = \sigma + \omega\epsilon''(\omega) \quad (2.9)$$

et

$$\sigma_T'' = -\omega\epsilon'(\omega); \epsilon_T^* \quad (2.10)$$

permittivité totale complexe (F/m)

$$\epsilon_T^* = \epsilon_T' - \epsilon_T''; \epsilon_T' = \epsilon'(\omega)\epsilon_T'' = \frac{\sigma}{\omega} + \epsilon''(\omega) \quad (2.11)$$

2.1.1.1 Dispersion dans les tissus

Lorsqu'un champ électrique alternatif est appliqué au tissu, sa permittivité varie en fonction de la fréquence, ε' diminuant progressivement avec l'augmentation de la fréquence au cours des phases de dispersion pour tendre vers la valeur de ε_0 . Ces phases de dispersion, relatives aux polarisations, reflètent donc un changement de comportement des charges du matériau et apparaissent à des plages de fréquences distinctes. Par exemple dans le régime statique ou les très basses fréquences ($< kHz$) toutes les polarisations peuvent se produire tandis que dans les plus hautes fréquences ($> GHz$) seules les polarisations par déformation subsistent. Pour les tissus biologiques trois principaux types de dispersion (α, β, γ) ont été identifiés [4, 5]. Pour caractériser ces phénomènes de dispersion dans un diélectrique, plusieurs modèles ont été proposés, dont les plus connus sont ceux de Debye et de Cole-Cole. Ces modèles consistent en l'approximation du phénomène de dispersion par un système du premier ordre avec une constante de temps (τ) correspondant au temps de relaxation. Celui de Cole se différencie en ajoutant un paramètre α puissance non entière de la fréquence, pour mieux représenter les phénomènes de dispersion observés expérimentalement. Avec ces modèles la permittivité s'écrit :

$$\varepsilon^* = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + (j\omega\tau)^{(1-\alpha)}} \quad (2.12)$$

Avec : τ : temps de relaxation ;

ε_∞ permittivité à fréquence élevée (F/m) ;

ε_s : permittivité statique (F/m) ;

α : paramètre dépendant du diélectrique ($0 < \alpha < 1$).

Le modèle électrique équivalent à l'équation mathématique de la permittivité donnée par Cole et al. [16] est composé d'une capacité $\varepsilon_\infty \frac{A}{d}$ en parallèle avec une impédance qui caractérise les phénomènes de dispersion dans le diélectrique. Cette impédance est composée d'une capacité $(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \frac{A}{d}$ en série avec un élément à phase constante (CPE) $\frac{\tau(j\omega\tau)^{-\alpha}}{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty} \frac{d}{A}$. En tenant compte des phénomènes de conduction, une impédance $\frac{1}{\sigma} \frac{d}{A}$ peut également être ajoutée en parallèle. Le facteur de forme du diélectrique est représenté par $\frac{A}{d}$ (A : surface et d : distance).

2.1.1.2 Propriétés de l'interface électrode/solution

Dans le cas où aucun courant électrique ne circule, il peut exister à l'interface entre une électrode et un électrolyte, une différence de potentiel. Cette différence de potentiel est due, selon le modèle de Helmholtz [4,3], à un équilibre électrostatique des charges défini sous le nom de "double couche électrique". La double couche est modélisée par Helmholtz par un condensateur plan. Elle est composée d'une accumulation de charges en excès (porteurs mobiles) à la surface de l'électrode faisant face à une accumulation de charges de signe opposé ainsi qu'aux différents ions en solution. L'ordre de grandeur de 1a, première couche ne dépasse pas quelques centaines de picomètres (couche compacte délimitée par le plan de Helmholtz pour des électrodes planes), celle-ci correspond en fait à l'ordre de grandeur des rayons ioniques plus la couche de solvatation. Dans cette théorie la capacité de double couche est similaire à celle d'un condensateur plan :

$$C_{dc,H} = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 S}{d} \quad (2.13)$$

Avec ε_0 = permittivité du vide ;

ε_r = permittivité du milieu ;

S = surface l'électrode du condensateur plan (surface mise en contact avec l'électrolyte ;

d = distance défini par plan de Helmholtz.

La théorie Helmholtz ne prend pas en compte les phénomènes de diffusion (agitation thermique) qui perturbent l'équilibre imposé par les forces électrostatiques, entraînant ainsi des observations expérimentales différentes des attentes théoriques. Les modèles de Gouy [3] puis celui de Chapman [14] sont venus compléter ce premier modèle. Leur modèle remplace la double couche par une couche diffuse où la distribution des ions varie en fonction de sa distance avec l'interface suivant une distribution de Boltzmann. Dans ce modèle les interactions sont supposées électrostatiques et les ions sont assimilés à des charges ponctuelles. Le potentiel électrique dans cette couche est accessible par l'équation de Poisson-Boltzmann [2] :

$$\frac{\partial^2 \phi(x)}{\partial x^2} = -\frac{1}{\varepsilon_r \varepsilon_0} \sum Z_i e c_i^\infty \exp\left(\frac{-z_i e (\phi(x) - \phi^\infty)}{kT}\right) \quad (2.14)$$

Avec :

ϕ^∞ = potentiel interne de la solution infiniment éloignée de l'interface ;

Z_i = charge de l'ion considéré ;

e = charge élémentaire ;

ec_i^∞ = concentration des ions i à une distance très éloignée de l'interface ;

T = température absolue en K ;

k = constante de Boltzmann.

La capacité de double couche pour ce modèle peut être déterminée à partir de l'équation suivante :

$$C_{dc, GC} = \left[\frac{2c^\infty e^2 \varepsilon_r \varepsilon_0}{KT} \right]^{1/2} \cosh \left[\frac{e}{2KT} (\phi(x) - \phi^\infty) \right] \quad (2.15)$$

Une évolution de la théorie précédente est le modèle de Stern [9], qui se comporte comme une combinaison des modèles de Helmholtz et de Gouy-Chapman. Cette théorie permet d'affiner le modèle de Gouy-Chapman à des distances très proches de l'électrode. La capacité obtenue est représentée par un condensateur de Helmholtz en série avec un condensateur de Chapman.

$$C_{dc, S} = \left[\frac{C_{dc, H} C_{dc, GC}}{C_{dc, H} + C_{dc, GC}} \right] \quad (2.16)$$

Le modèle de Stern est lui-même poussé encore plus loin par celui de Graham qui introduit l'adsorption spécifique des ions [3]. Ce modèle consiste à distinguer une nouvelle couche dont la limite est appelée PIH (Plan Interne de Helmholtz) située à l'intérieur de l'ancienne couche de Helmholtz PEH (Plan Externe de Helmholtz). Cette couche (électrode-PIH) est en fait composée des molécules de solvant fixées à l'électrode par adsorption, associées aux ions subissant une interaction forte (donc dépourvue de couche de solvation). Ce modèle est valable dans le domaine des basses fréquences.

2.1.1.3 Modèles électriques de l'interface électrode/solution

Warburg fut l'un des premiers à identifier les phénomènes liés à la diffusion ionique dans une solution associée à des électrodes métalliques [10]. Ses travaux permirent d'obtenir une modélisation de l'interface électrode/solution qui fait encore référence actuellement. Cette modélisation se présente sous forme d'un élément à phase constante (CPE) souvent représenté par une résistance en série avec une capacité ($Z_P = R_p - jX_p$), dépendant de la fréquence mais également du métal, de la solution, de la température et de la densité de courant. En effet, il a été prouvé dans ces études que pour des courants de faible densité le comportement de ces deux paramètres (résistance et capacité de polarisation) évolue de manière inversement

proportionnelle avec la racine carrée de la fréquence X_p et $R_p \simeq k\sqrt{f}$ avec un angle de perte constant égal à $\phi = \pi/4$.

Les travaux de H. Fricke [6] sur les phénomènes de polarisation d'une électrode métallique traversée par un courant alternatif ont conduit à l'approfondissement du modèle de Warburg. Fricke a étendu les relations concernant les paramètres définis par Warburg notamment en étudiant ces phénomènes sur plusieurs métaux et dans un domaine de fréquences plus large. Il en conclua que la capacité et la résistance de polarisation évoluaient comme inversement proportionnelle d'une fonction puissance de la fréquence [12]

$$X_p \approx f^{-m}; \text{ et } R_p \approx f^{-(1-m)}; \phi = \frac{m\pi}{2} \quad (2.17)$$

Avec m dépendant, de la fréquence dans la plupart des cas. Ces équations ont ensuite été approfondies pour justifier la variation des paramètres suivant le type de métal et d'électrolyte [5, 6, 9]. Les parties résistives et réactive de l'impédance de Warburg s'écrivent finalement :

$$X_p \simeq \sigma_1 \cdot f^{-\alpha}; R_p \simeq \sigma_2 \cdot f^{-\beta}$$

Le courant circulant à travers une interface électrode/solution est souvent décomposé en deux parties. Un courant capacitif représente la partie du courant chargeant la double couche de polarisation et un courant faradique représente les courants liés au transfert de charge et à la diffusion. Le modèle de Warburg a été modifié pour faire apparaître une impédance capacitive et une impédance faradique (passage d'un courant continu) en parallèle permettant d'expliquer ces différents passages de courant à travers l'interface. L'impédance faradique se décompose également en deux parties : résistance de transfert de charge et impédance de diffusion (impédance de Warburg) [2]. Ce modèle est appelé modèle de Randles [13, 14]. Sur le diagramme de Nyquist du modèle de Randles, l'impédance de Warburg apparaît clairement dominante dans les basses fréquences, tandis que pour les hautes fréquences, l'interface électrode/électrolyte se comporte comme un circuit dit RC parallèle (R représentant la combinaison de la résistance de transfert de charge et de la résistance de l'électrolyte et C la capacité de double couche)[13].

2.1.2 Modélisation de l'électrolyte et des électrodes de référence en chambre d'Ussing

Les électrodes de mesure déterminant la précision des résultats, leur préparation est importante. Avant toute mesure une vérification de la stabilité de la tension entre le couple d'électrode utilisé est nécessaire. Cette stabilité est vérifiée à l'aide d'un voltmètre relié aux deux électrodes, un pont salin (*agarose/3MKCl*) réalisant une connexion ionique entre les deux réservoirs de chlorure de potassium 3 molaires (*KCl3M*). La détermination du modèle regroupant les éléments : électrodes au Calomel, ponts salins et électrolyte a été également réalisée par impédancemétrie $10Hz - 50kHz$ en imposant une tension d'amplitude constante 20mV entre les électrodes de travail en acier inoxydable. Le bullage a également été conservé pour la mesure. Le principal résultat observé dans ces mesures a été le comportement capacitif du montage, un effet de filtrage passe-bas agissant dès 10kHz apparaît clairement. Cet effet filtrage ne peut pas être uniquement attribué à l'amplificateur d'entrée de l'électronique, les tests de calibration et d'étalonnage sur éléments discrets ne l'ayant pas révélé. Les données constructives confirment ce constat en donnant une bande passante pour un gain 10 de l'amplificateur supérieure à 500kHz et une capacité d'entrée de $2pF$. Un comportement capacitif similaire est également reporté pour une chambre d'Ussing par Gitter et al. [3] ainsi que dans la technique du patch clamp [4, 8]. Cet effet est donc attribuable au couple d'électrodes de Calomel / ponts salins dont la résistance est souvent supérieure à plusieurs kilo Ohm et qui forment avec la capacité d'entrée de l'amplificateur et celle des câbles un filtre passe-bas. Il est composé d'une résistance R_f qui représente la résistance du Ringer entre les électrodes de mesure et de deux couples $R_{e1}C_e$ et $R_{e2}C_g$ qui symbolisent le filtrage passe-bas des électrodes de mesures. Les résistances R_{e1} et R_{e2} différentes, leur évaluation en sortie de l'amplificateur d'instrumentation est impossible. C'est pourquoi nous avons tenu compte de cette erreur simplement en tant que filtre du premier ordre et pour éviter des erreurs d'interprétation nous avons limité la plage de fréquence à $10Hz - 2kHz$. La représentation du Ringer par une résistance est justifiée par le caractère purement résistif de l'impédance dans les basses fréquences.

2.2 Conclusion

Les différentes interfaces présentes dans les chambres d'Ussing modifiées semblent pouvoir être modélisées correctement par les schémas présentés. Cependant les paramètres de ces modèles sont fortement dépendants des électrodes utilisées. Dans l'objectif de vouloir rendre la technique de chambres d'Ussing plus simple d'utilisation, il a fallu tenir compte de ces contraintes liées aux interfaces. Il sera question dans le chapitre suivant de modéliser et de simuler les équations de Cole sous ses différentes formes.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Dans le chapitre précédent nous avons modélisé l'équation d'Ussing, dans ce chapitre nous allons présenter le principe de fonctionnement des molécules. Il sera question dans ce chapitre de modéliser l'équation de Cole-Cole sous ses différentes formes, de construire les courbes dérivées de ces équations afin d'en discuter.

3.1 Relaxation et résonance

La diminution de la polarisation en l'absence d'un champ électrique, en raison de l'apparition d'un champ dans le passé, est indépendante de l'histoire diélectrique et ne dépend que de la valeur de la polarisation d'orientation à l'instant, avec laquelle elle est proportionnelle. Considérons la constante de proportionnalité $1/\tau$ on obtient l'équation différentielle suivante pour la polarisation en l'absence d'un champ :

$$\dot{p}_{or}(t) = -\frac{1}{\tau} p_{or}(t) \quad (3.1)$$

La solution est donnée par la relation par :

$$p_{or}(t) = -\frac{1}{\tau} p_{or}(0) e^{-t/\tau} \quad (3.2)$$

Il en résulte que dans ce cas, la fonction réponse de la polarisation est donnée par une exponentielle suivant la relation

$$\alpha_p^{or}(t) = e^{-t/\tau} \quad (3.3)$$

Où la constante de temps τ est appelé temps de relaxation. A partir de (3.3) on obtient pour la fonction réponse d'impulsion aussi une décroissance exponentielle avec la même constante de temps.

$$\Phi_p^{or} = \dot{\alpha}_p^{or}(t) = e^{-t/\tau} \quad (3.4)$$

La permittivité diélectrique complexe peut être écrite de la manière suivante :

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)L[\Phi_p^{or}] \quad (3.5)$$

avec $L[\Phi_p^{or}]$ est l'expression de la transformée de Laplace. En substituant dans l'équation (3.4) on obtient

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)}{\tau}L\left(e^{-t/\tau}\right) = \varepsilon_\infty + \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)}{1 + i\omega\tau} \quad (3.6)$$

$$\varepsilon^*(w) = \varepsilon'(w) - j\varepsilon''(w) \quad (3.7)$$

En séparant les parties réelles et imaginaires on obtient les formules de Debye

$$\varepsilon' = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + \omega^2\tau^2} \quad (3.8)$$

$$\varepsilon'' = \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)\omega\tau}{1 + \omega^2\tau^2} \quad (3.9)$$

Il vient que

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)}{1 + \omega^2\tau^2} + j\frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)\omega\tau}{1 + \omega^2\tau^2} = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + \omega^2\tau^2}(1 - j\omega\tau) \quad (3.10)$$

Or

$$1 + \omega^2\tau^2 = (1 - j\omega\tau)(1 + j\omega\tau) \quad (3.11)$$

il vient donc

$$\varepsilon^*(\omega) - \varepsilon_\infty = \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)}{1 + j\omega\tau} \quad (3.12)$$

Pour un grand nombre de système condensés, de nombreux autres systèmes de graves écarts se produisent s'il n'y a plus d'un pic de relaxation, nous pouvons supposer différentes parties de la polarisation d'orientation à décliner avec différents temps de relaxation.

$$\alpha_p^{or}(t) = \sum_k g_k \exp\left(-t/\tau_k\right) \quad (3.13)$$

$$\Phi_p^{or}(t) = \sum_k \frac{g_k}{\tau_k} \exp\left(-t/\tau_k\right) \quad (3.14)$$

soit

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \sum_k \frac{g_k}{1 + i\omega\tau_k} \quad (3.15)$$

Avec

$$\sum_k g_k = 1 \quad (3.16)$$

Pour une distribution continue des temps de relaxation

$$\alpha_p^{or}(t) = \int_0^{\infty} \frac{g(\tau)}{\tau} \exp\left(-t/\tau\right) d\tau \quad (3.17)$$

$$\Phi_p^{or}(t) = \int_0^{\infty} \frac{g(\tau)}{\tau} \exp\left(-t/\tau\right) d\tau \quad (3.18)$$

Avec

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_{\infty} + (\varepsilon_s - \varepsilon_{\infty}) \int_0^{\infty} \frac{g(\tau)}{1 + i\omega\tau} d\tau \quad (3.19)$$

avec

$$\int_0^{\infty} g(\tau) d\tau = 1 \quad (3.20)$$

Les équations (3.17) jusqu'à (3.19) semblent être suffisamment général pour permettre une description adéquate de la polarisation d'orientation de presque tous les systèmes condensés dans les champs en fonction du temps. Et la valeur caractéristique de la distribution de temps de relaxation. A très hautes fréquences, cependant, les écarts par rapport à l'équation (3.20) doit toujours se produire, ce qui correspond aux déviation par rapport à (3.18) et (3.19) à des valeurs de t qui sont petites par rapport au caractéristique de τ_0 dans la distribution du temps de relaxation.

Lorsqu'on change la polarisation, sans changé la vitesse instantanée, elle correspond à une variation instantanée de l'accélération des mouvements cellulaires.

L'influence de la force dépend du champ électrique. Physiquement cela est dû au comportement des fonctions de réponses à $t = 0$. On a plusieurs changements de polarisation. Il en résulte que la dérivée de la fonction réponse indicielle de la polarisation $t=0$ doit être égale à 0. Ce qui contraste avec le comportement de l'équation (3.3); (3.13); et (3.18) pour la relaxation diélectrique.

$\varepsilon^*(\omega)$ ne tient pas à des très hautes fréquences. Par conséquents, ces équations ne peuvent pas décrire adéquatement le comportement de la fonction de réponse quasi $t=0$, et les expressions correspondantes sont représentées par la courbe ci-dessous.

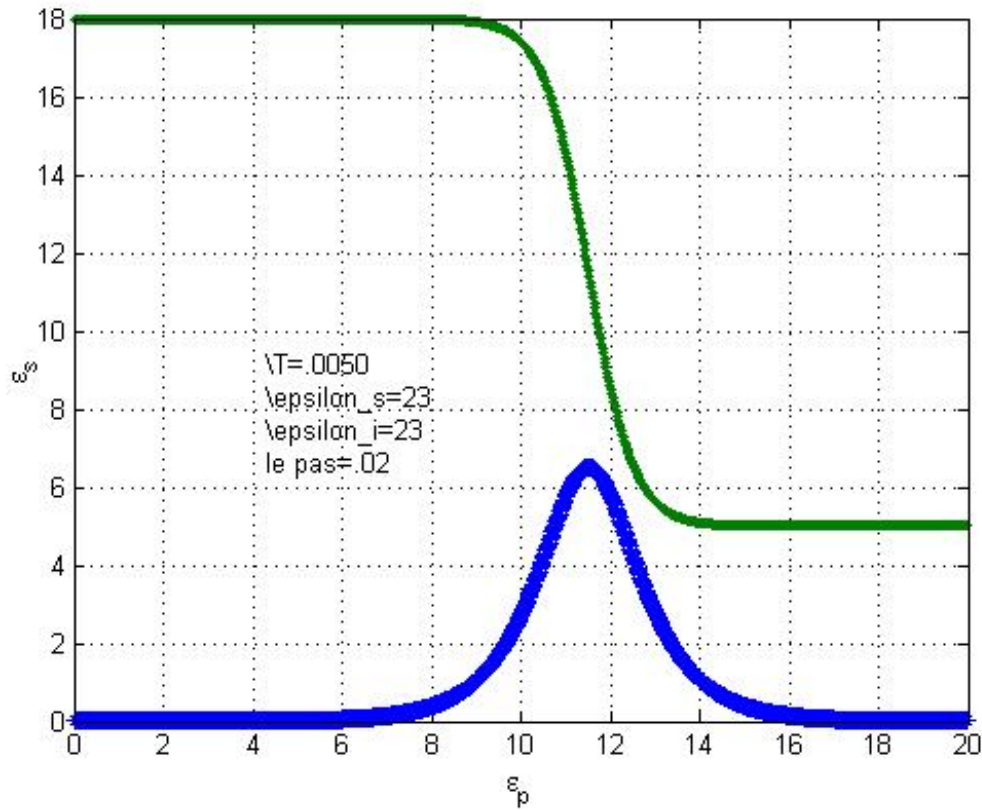


FIGURE 3.1 – Courbe de la dispersion diélectrique et de perte pour un composé polaire dans la phase condensée. En vert(ϵ') en bleue (ϵ'')

♠ Interprétation

Le comportement de la polarisation induite dans des domaines dépendant du temps, peut être décrite de manière phénoménologique. A des fréquences correspondantes aux temps caractéristiques des mouvements intermoléculaires par lequel la polarisation induit se produit.

Il y'a des raies d'absorption vives, en raison des niveaux d'énergie discrets de ces mouvements. Dans une première approximation, ces raies d'absorptions correspondant aux fonctions delta de la dépendance en fréquence de

$$\epsilon'' = \sum_k A_k \delta(\omega - \omega_k) \quad (3.21)$$

La correspondance de la fréquence ϵ' nous permet d'écrire l'équation de **Kramers-Kronig** donné par la relation

$$\epsilon' = 1 + \frac{2}{\pi} \sum \frac{\omega_k A_k}{\omega_k^2 - \omega^2} \quad (3.22)$$

En posant $\omega = 0$ on obtient l'expression de la permittivité diélectrique à l'infinie ε_∞ . Soit

$$\varepsilon_\infty(\omega) = 1 + \frac{2}{\prod} \sum \frac{A_k}{\omega_k} \quad (3.23)$$

Au niveau de chaque fréquence sur laquelle une raie d'absorption est située, la catastrophe dite de résonance ε'' résulte de l'équation (3.17) pour que les raies d'absorptions soient infiniment étroites.

Présenter ces termes en terme de polarisation, on peut supposer qu'en absence d'un champs électrique le comportement dépendant du temps de la polarisation est régie par une équation différentielle du second ordre : qui est la même équation que pour un oscillateur harmonique en l'absence d'amortissement, auquel la résonance terme est applicable.

$$\ddot{p}(t) = -\omega_k^2 p(t) \quad (3.24)$$

3.2 Description empirique de relaxation diélectrique

Le comportement de la polarisation d'orientation de la plupart des systèmes condensés dans des champs dépendant du temps peut, en bonne approximation, être caractérisé par une répartition des temps de relaxation. Ce comportement est généralement désigné comme la relaxation diélectrique. Ceci implique que la permittivité diélectrique complexe, qui caractérise le comportement du système dans les champs harmoniques, dans la plage de fréquences correspondant aux temps caractéristiques de la réorientation cellulaire peut être écrit à l'équation (3.19), ou si une fonction de distribution logarithmique est utilisée :

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \int_0^\infty \frac{G(\ln \tau) d(\ln \tau)}{1 + i\omega\tau} \quad (3.25)$$

Avec

$$\int_0^\infty G(\ln \tau) d(\ln \tau) = 1 \quad (3.26)$$

Les expressions correspondantes pour les fonctions de réponse α sont :

$$\alpha_p^{or}(t) = \int_0^\infty G(\ln \tau) \exp\left(-t/\tau\right) d(\ln \tau) \quad (3.27)$$

$$\Phi_p^{or}(t) = \int_0^\infty G(\ln \tau) \left(\frac{\exp(-t/\tau)}{\tau} \right) d(\ln \tau) \quad (3.28)$$

Où α est un simple temps de relaxation.

Les expressions simples qui peuvent être utilisés pour la description des données de relaxation expérimentales sont celles pour un seul temps de relaxation : les expressions simples qui peuvent être utilisés pour la description des données de relaxation expérimentales sont celles pour un seul temps de relaxation :

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + i\omega\tau}, \quad \varepsilon'(w) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 - \omega^2\tau^2}, \quad \varepsilon''(\omega) = \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)\omega\tau}{1 + \omega^2\tau^2} \quad (3.29)$$

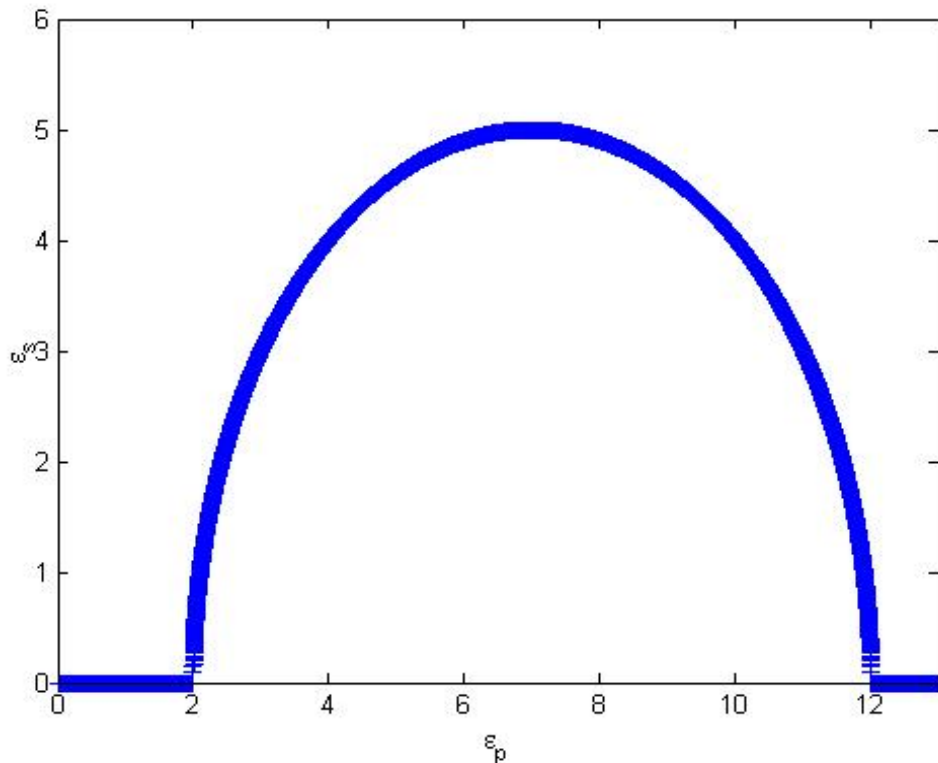


FIGURE 3.2 – Courbe Cole-Cole pour un seul temps de relaxation (calculé) $\varepsilon'' = f(\varepsilon')$.

La courbe est un demi-cercle ou cône d'abscisse ε' et ε'' l'ordonnée. Pour le cas d'un seul temps de relaxation des points, il est préférable de déterminer les valeurs des paramètres impliqués par une méthode graphique différente qui a été suggéré par Cole en traçant ε'' et ε' bien que l'intrigue Cole-Cole est très utile d'étudier si les valeurs expérimentales de ε' et ε'' sont

connues.

$$\omega \varepsilon''(\omega) = \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)\omega^2 \tau}{1 + \omega^2 \tau^2} = \frac{1}{2}(\varepsilon_s - \varepsilon'(w)) \quad (3.30)$$

$$\frac{\varepsilon''(w)}{w} = \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)\omega^2 \tau}{1 + \omega^2 \tau^2} = 3(\varepsilon'(w) - \varepsilon_\infty) \quad (3.31)$$

3.3 L'équation de Cole-Cole

La première expression empirique de $\varepsilon^*(\omega)$ de K.S. Cole et R.H. Cole en 1941

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + (i\omega\tau_0)^{1-\gamma}} \quad (3.32)$$

$$\varepsilon'(w) = \varepsilon_\infty + (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \frac{1 + (\omega\tau_0)^{1-\gamma} \sin(\frac{\gamma\pi}{2})}{1 + 2(\omega\tau_0)^{1-\gamma} \sin(\frac{\gamma\pi}{2}) + (\omega\tau_0)^{2(1-\gamma)}} \quad (3.33)$$

$$\varepsilon''(\omega) = (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \frac{(\omega\tau_0)^{1-\gamma} \cos \frac{1}{2}\pi\gamma}{1 + 2(\omega\tau_0)^{1-\gamma} \sin \frac{1}{2}\pi\gamma + (\omega\tau_0)^{2(1-\gamma)}} \quad (3.34)$$

L'expression de la fonction de réponse d'impulsion est obtenu directement à l'aide de la transformée de Laplace inversé de l'expression de Cole-Cole.

Nous pouvons aussi obtenir la fonction impulsion réponse indirectement par le développement en série d'après l'équation (3.21).

En utilisant la transformée de Laplace nous pouvons aussi avoir

$$\Phi_p^{or}(t) = \frac{1}{\tau_0} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{\Gamma\{n(\gamma-1)\}} \left(\frac{t}{\tau_0}\right)^{-n(1-\gamma)-1} \quad t \rightarrow \infty \quad (3.35)$$

3.4 Equation Cole-Davidson

En 1950, Davidson et Cole donne une autre expression de $\varepsilon^*(\omega)$

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)}{(1 + i\omega\tau_0)^\beta} \quad (3.36)$$

En posant $\beta = 1$ on retrouve l'équation de Debye. on peut écrire

$$1 + i\omega\tau_0 = e^{i\varphi} \sqrt{1 + \omega^2 \tau^2} = e^{i\varphi} / \cos \varphi \quad (3.37)$$

et en posant

$$\varepsilon^* = \varepsilon'(\omega) - i\varepsilon'' \quad (3.38)$$

On retrouve

$$\varepsilon'(\omega) = \varepsilon_\infty + (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \cos \varphi^\beta \cos \beta \varphi \quad (3.39)$$

$$\varepsilon'' = (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \cos \varphi^\beta \sin \beta \varphi \quad (3.40)$$

Avec $\varphi = \arctg \omega \tau_0$.

De l'équation de Cole-Davidson, la fonction impulsion-réponse peut être obtenue directement en posant la transformée de Laplace inverse :

$$\Phi_p^{or}(t) = \frac{1}{\tau_0 \Gamma(\beta)} \left(\frac{t}{\tau_0} \right)^{\beta-1} e^{-t/\tau_0} \quad (3.41)$$

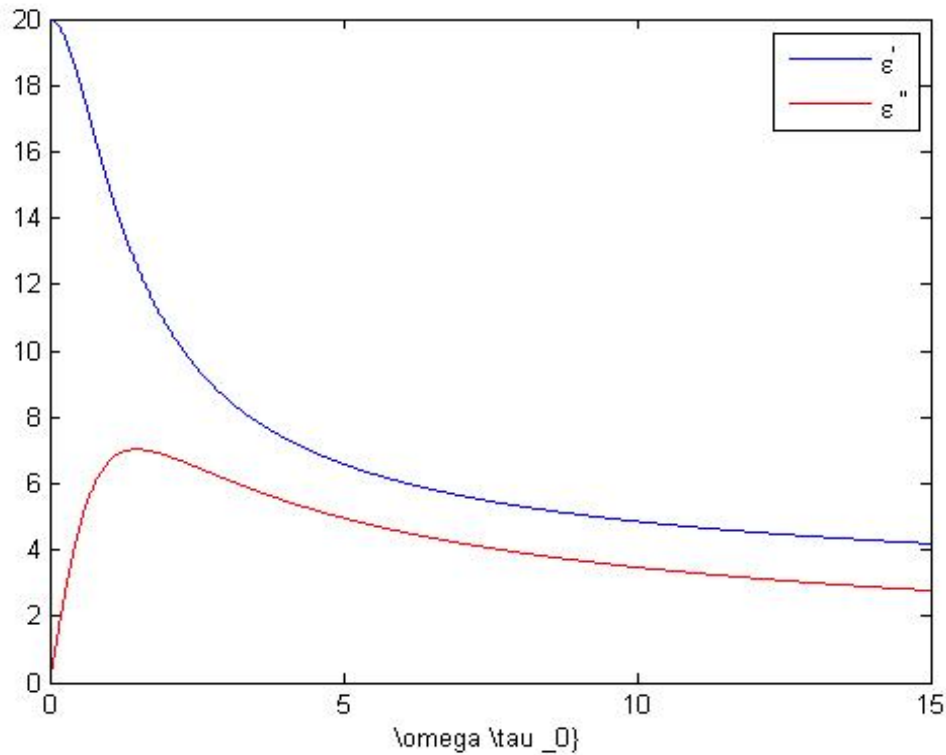


FIGURE 3.3 – Courbes de dispersion et de perte pour l'équation Cole-Davidson avec $\beta = 0.5$

3.5 L'équation Havriliak-Negami

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)}{\{(1 + i\omega\tau_0)^{1-\gamma}\}^\beta} \quad (3.42)$$

En posant

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon'(\omega) - j\varepsilon''(\omega) \quad (3.43)$$

on procède à la séparation pour déterminer le terme imaginaire et le terme réel. En posant $\gamma = 0$ et $\beta = 1$ on retrouve l'équation de Cole-Davidson de l'équation (3.42), on peut déduire $\varepsilon'(\omega)$ et $\varepsilon''(\omega)$ par la relation

$$\varepsilon'(\omega) = \varepsilon_\infty + (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \frac{\cos \beta\varphi}{\left\{1 + 2(\omega\tau_0)^{1-\gamma} \sin \frac{1}{2}\pi\gamma + (\omega\tau_0)^{2(1-\gamma)}\right\}^{\frac{\beta}{2}}} \quad (3.44)$$

$$\varepsilon''(\omega) = (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \frac{\sin \beta\varphi}{\left\{1 + 2(\omega\tau_0)^{1-\gamma} \sin \frac{1}{2}\pi\gamma + (\omega\tau_0)^{2(1-\gamma)}\right\}^{\frac{\beta}{2}}} \quad (3.45)$$

On obtient

$$\varphi = \frac{\text{arctg} \left[(\omega\tau_0)^{1-\gamma} \cos \frac{1}{2}\pi\gamma \right]}{1 + (\omega\tau_0)^{1-\gamma} \sin \frac{1}{2}\pi\gamma} \quad (3.46)$$

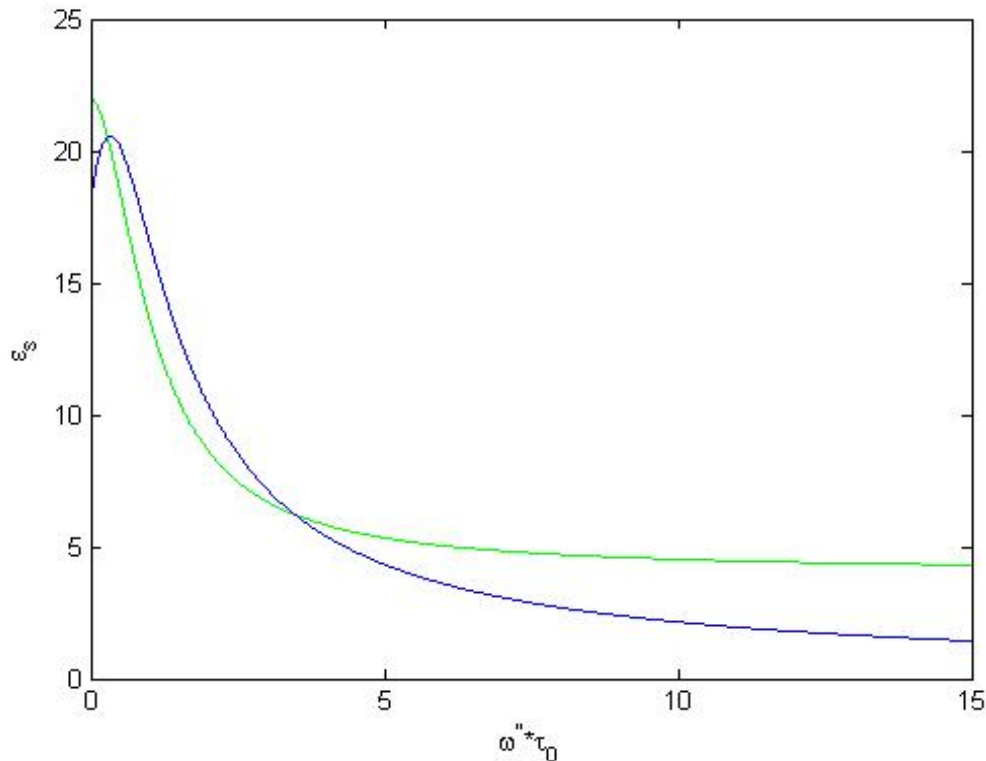


FIGURE 3.4 – Courbes de dispersion et de perte pour l'équation Havriliak-Negami avec $\beta = 0.5$

3.6 La description de Fuoss-Kirkwood

Fuoss et Kirkwood ont démontré que dans le cas d'un seul temps de relaxation, le facteur de perte est donné sous la forme :

$$\varepsilon''(\omega) = \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)\omega\tau_0}{1 + \omega^2\tau_0^2} = \varepsilon_m'' \operatorname{sech}(\ln \omega\tau_0) \quad (3.47)$$

Où ε_m'' est la valeur maximum de $\varepsilon''(\omega)$. Elle peut s'écrire sous la forme

$$\varepsilon_m'' = \frac{1}{2}(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \quad (3.48)$$

L'équation (3.47) peut être généralisée sous la forme

$$\varepsilon'' = \varepsilon_m'' \operatorname{sech}(\alpha \ln \omega\tau_0) \quad (3.49)$$

Où γ est un paramètre tel que $0 < \gamma \leq 1$ qui n'est pas différent de l'expression $\varepsilon_m'' = \frac{1}{2}(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)$ lorsque nous appliquons cette relation de Kramer-Kronig, on trouve l'équation de fuoss-Kirkwood

$$\varepsilon_m'' = \frac{1}{2}\gamma(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \quad (3.50)$$

En faisant varier (γ) dans l'équation de Colle-Cole, une différence importante entre les deux paramètres est que l'équation de Fuoss-Kirkwood change dans l'expression d'un temps de relaxation unique si (γ) introduit dans l'équation (3.44) doit être distingué de (γ) le paramètre.

◇ La description de Jonscher

L'équation Fuoss-Kirkwood peut également être écrit sous la forme :

$$\varepsilon''(\omega) = \frac{\varepsilon_m''}{\left(\frac{\omega}{\omega_0}\right)^{-\gamma} + \left(\frac{\omega}{\omega_0}\right)^{\gamma}} \quad (3.51)$$

Jonscher généralise ε_m'' sous la forme

$$\varepsilon''(\omega) = \frac{\varepsilon_m''}{\left(\frac{\omega}{\omega_1}\right)^{-m} + \left(\frac{\omega}{\omega_2}\right)^{1-n}} \quad (3.52)$$

Avec $0 < m \leq 1; 0 \leq n < 1$ la fréquence maximale est :

$$\omega_m = \left[\frac{m}{1-n} \omega_1^m \omega_2^{1-n} \right]^{1/(m-n+1)} \quad (3.53)$$

Cette expression donne des lignes droites pour les fréquences basse et haute puisqu'il faut respectivement :

$$\varepsilon''(\omega) = A \left(\frac{\omega}{\omega_1} \right)^m \quad \omega \rightarrow 0 \quad (3.54)$$

$$\varepsilon''(\omega) = A \left(\frac{\omega}{\omega_1} \right)^{n-1} \quad \omega \rightarrow \infty \quad (3.55)$$

Conclusion

Le but de ce chapitre était de présenter l'équation de Cole-Cole sous ses différentes formes et de faire les différentes simulations numérique de ces dernières. D'après ces études, il en ressort que l'on peut modéliser et simuler les différentes cellules et maladies existantes.

Implications pédagogiques dans le système éducatif

L'implication pédagogique pour un travail scientifique constitue l'ensemble des techniques et méthodes dégagées par celle-ci dans le but d'apporter une compréhension, voire la résolution des problèmes liés à l'apprentissage de la discipline. Ce travail permet de modéliser la cellule et trouver son analogie en physique. Par conséquent il nous permet de maîtriser les T. I. C, d'appréhender le programme des classes du secondaire de l'enseignement général, notamment en classe de terminale scientifique sur la leçon intitulée les oscillateurs électriques. On peut également mentionner la leçon sur les dipôles électriques en classe de seconde scientifique. C'est aussi à partir de ce travail qu'on comprend maintenant comment on est parti de l'œil biologique à l'œil physique en classe de première scientifique.

Conclusion générale et perspectives

Dans le cadre du travail de ce mémoire, il était question de modéliser le comportement des phénomènes de polarisation dans les cellules vivantes : cas des épithéliums intestinaux. A partir des équations régissant la dynamique des cellules. Après avoir fait un parcours panoramique sur les cellules, nous avons au chapitre 2 présenté les techniques et méthodes à travers la chambre d'Ussing. Nous avons présenté l'aspect physiologique de la barrière intestinale, puis le mécanisme de transport transcellulaire. Elle est suivie d'une description des phénomènes physiques induits et se termine par la présentation des différentes techniques de mesure et d'évaluation de la chambre d'Ussing. Dans le chapitre 3, nous avons appliqué les méthodes développées au chapitre 2 pour réaliser les analyses numériques pour le système biologique et comparer avec le système électronique équivalent. Dans cette analyse, il ressort que lorsque le paramètre de dispersion du diélectrique diminue, la cellule perd en énergie et sa durée de vie dans la chambre d'Ussing est réduite. Ceci montre qu'un système biologique peut être approché par un système électronique. Ce qui constitue une avancée importante dans l'électronique médicale, plus précisément dans le domaine de l'électrophysiologie présentant des applications importantes dans la médecine.

Dans un futur proche, il sera question de mieux établir une correspondance entre le système tissulaire et le système électronique et réaliser les études complètes permettant d'éviter les essais cliniques sur les cellules vivantes ; mais concevoir un système électronique équivalent qui donnera des réponses plus précises. Enfin une étude plus précise sur la calibration de la chambre d'Ussing reste cependant nécessaire.

Bibliographie

- [1] B. Alberts. Biologie moléculaire de la cellule. Flammarion, 2004.
- [2] G. Alengrin. Méthode de synthèse de correcteurs numériques. Techniques de l'ingénieur, R7420, 1996.
- [3] J.M. Anderson. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol. Sci.*, 16 :126-130, 2001.
- [4] . Artursson. Epithelial transport of drugs in cell culture. i : a model for studying the Passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *J. Pharm. Sci.*, 79(6) :476-482 1990
- [5] P. Artursson and J. Karlsson. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 175(3) :880-885, 1991
- [6] P. Artursson, K. Palm, and K. Luthman. Caco-2 monolayers in experimental and Theoretical predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46 :27-43, 2001.
- [7] M.S. Awayda, W. Van Driessche, and S.I. Helman. Frequency dependent capacitance of the apical membrane of frog skin : dielectric relaxation processes.

- Biophys. J., 76 :219-232, 1999.
- [8] H. Bohets, P. Annaert, G. Mannens, L. Van Beijsterveldt, K. Anciaux, P. Verboven, W. Meuldermans, and K. Lavrijsen. Strategies for absorption screening in drug discovery and development. *Current Topic in Medicinal Chemistry*, 1 :367-383, 2001.
- [9] F. Bordi, C. Cametti, and A. Gliozzi. Impedance measurements of self-assembled lipid bilayer membranes on the tip of an electrode. *Bioelectrochemistry*, 57 :39-46, 2002.
- [10] D.A. Borkholder. Cell based biosensors using microelectrodes. PhD thesis, Stanford University, 1998.
- [11] G. Boudry. The Ussing chamber technique to evaluate alternatives to in-feed antibiotics for young pigs. *Anim. Res.*, 54 :219-230, 2005.
- [12] A.E. Cárdenas, R.D. Coalson, and M.G. Kumikova. Three-dimensional Poisson-Nernst-Planck theory studies : influence of membrane electrostatics on Gramicidin A channel conductance. *Biophys. J.*, 79 :80-93, 2000.
- [13] B.Y. Chang and S.M. Park. Integrated description of electrode/electrolyte interfaces based on equivalent circuits and its verification using impedance measurements. *Anal. Chem.*, 78 :1052-1060, 2006.
- [14] D.L. Chapman. A contribution to the theory of electrocapillarity. *Phil. Mag.*, 25 :475-481, 1913.